

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE – FACES
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

JESSICA GIVONI FELÍCIO PAPANTONY

MÉTODOS DE ENGENHARIA DE TECIDO APLICADOS AO ESTUDO DE DOENÇAS INFECCIOSAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em
forma de artigo como requisito ao curso de
Biomedicina do UniCEUB, sob orientação do
prof. Paulo Roberto Martins Queiroz.

BRASÍLIA – 2019

Métodos de Engenharia de Tecido Aplicados ao Estudo de Doenças Infecciosas

Jéssica Givoni Felício Papantony¹
Paulo Roberto Martins Queiroz²

Resumo

Por vários anos, metodologias de pesquisa translacional utilizaram cobaias animais para seus experimentos clínico-farmacológicos, levantando questionamentos éticos quanto ao uso dos mesmos para progredir o conhecimento científico. Técnicas de cultura de tecido unicelular *in vitro* foram criadas para reduzir o uso de modelos animais, mas não eram capazes de reproduzir as interações patógeno-hospedeiro de forma fidedigna a de um sistema *in vivo*. Avanços pioneiros na área de biotecnologia e biologia do desenvolvimento, como a descoberta de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), levaram a eventual criação de “organóides,” estruturas de tecido multicelular cultivadas em cultura capazes de simular a morfologia e funcionamento de seletos órgãos do corpo humano. Através de uma metodologia de revisão bibliográfica narrativa, o objetivo deste trabalho foi revisar o conhecimento atual de engenharia de tecidos voltados para a pesquisa de modelos de doença. Conclui-se que a aplicação interdisciplinar de metodologias de engenharia de tecidos possui um alto potencial para aprofundar o estudo de modelos de doenças e, junto a outras metodologias, avançar o conhecimento nesta área.

Palavras-Chave: Organóide; Enteróide; Células-tronco; Células-tronco pluripotentes induzidas.

Tissue Engineering Methods Applied to the Study of Infectious Disease

Abstract

For many years, translational research methods relied on animal test subjects to conduct their clinical and pharmacological experiments, raising ethical questions about their use to further progress scientific knowledge. *In vitro* unicellular tissue culture techniques were created to minimize the use of animal models, but they were not capable of reproducing pathogen-host interactions as accurately as an *in vivo* system. Pioneering advancements in biotechnology and developmental biology, such as the discovery of induced pluripotent stem cells (iPSCs), have paved the way for the creation of “organoids”, multicellular tissue structures capable of mimicking morphology and function of select human organs. Through the use of a narrative bibliographic review, the objective of this work was to review the current knowledge of tissue engineering aimed at the research of disease models. It is concluded that the interdisciplinary application of tissue engineering methodologies has a high potential to deepen the study of disease models and, together with other methodologies, advance knowledge in this area.

Keywords: Organoid; Enteroid; Stem Cells; Induced Pluripotent Stem Cells.

¹ Acadêmica de Biomedicina do UniCEUB

² Professor do UniCEUB

1. INTRODUÇÃO

Desde o advento da medicina moderna, várias perguntas a respeito do desenvolvimento humano têm sido respondidas, mas ainda há muito a ser estudado. Alguns dos tópicos mais proeminentes, que têm sido extensamente abordados, porém ainda não são completamente entendidos, abrangem as áreas da embriogênese, organogênese, interações droga-paciente e interações patógeno-hospedeiro (SIMIAN; BISSELL, 2017).

Por vários anos, as tentativas feitas para responder tais perguntas eram realizadas a partir de métodos tradicionais de pesquisa translacional, utilizando-se culturas celulares bidimensionais crescidas em placas de petri ou cobaias animais. A medida que a pesquisa nestas áreas progredia, uma pergunta crítica se tornou aparente: quão similares aos mecanismos do sistema humano *in vivo* eram os resultados encontrados? (XU et al., 2018).

Na pesquisa de doenças infecciosas, por exemplo, certos obstáculos tornaram-se claros: alguns patógenos eram exclusivos do ser humano, impossibilitando a reprodução acurada de sua fisiopatologia em modelos animais; culturas celulares tradicionais bidimensionais careciam a arquitetura tecidual necessária para corretamente reproduzir a interação patógeno-hospedeiro; e, por fim, alguns patógenos não conseguiam sequer ser cultivados nestes meios, dificultando-se o estudo e compreensão dos mecanismos de ação dos mesmos (MILLS; ESTES, 2016).

A engenharia de tecidos, um ramo interdisciplinar relativamente recente da medicina que se utiliza da manipulação de células-tronco e biomateriais com o propósito de confeccionar porções funcionais de tecido humano, surgiu inicialmente como um ramo da medicina regenerativa, mas rapidamente passou a ser utilizado para a pesquisa do desenvolvimento humano e modelos de estudo da evolução de doenças, tanto genéticas quanto infecciosas (NUGRAHA, 2019).

Para se atingir quaisquer uns destes propósitos, a engenharia de um tecido requer a interação entre três aspectos principais: (1) o uso de moléculas bioativas, tais como, fatores de crescimento que induzam a diferenciação e proliferação celular; (2) a produção de células capazes de responder a tais sinais de maneira correta; e (3) o uso de moldes biocompatíveis que sirvam de substitutos para a matriz extracelular (MEC) do tecido em questão, gerando um microambiente que suporte a proliferação da linhagem celular desejada (AKTHAR, 2017).

A partir do interfaceamento destes três pilares em técnicas de pesquisa, a criação de uma das principais conquistas da área se tornou possível: os organóides, estruturas derivadas de células-tronco pluripotentes (PSCs) ou órgãos progenitores, capazes de se diferenciar e formar um tecido de múltiplas linhagens celulares (epiteliais/mesenquimais) que se auto-organizam

em uma conformação não muito diferente ao de um órgão *in vivo* (LANCASTER; KNOBLICH, 2014).

A criação dos organóides como atualmente são estudados se deu inicialmente em 1957, com a tentativa de Lasfargues de dissociar glândulas mamárias em organóides, mas as técnicas da bioengenharia que possibilitaram tal feito podem ser datadas desde 1906 (SIMIAN; BISSELL, 2017).

Nos últimos dez anos, os avanços nas técnicas de cultura e a comercialização em massa de insumos para a mesma (como o Matrigel™, uma mistura protéica que simula a MEC - Matriz ExtraCelular) fizeram com que houvesse um crescimento exponencial em pesquisa na área, com milhares de pesquisas sobre o tópico ocorrendo apenas nos últimos dois anos (NUGRAHA et al., 2019).

Entre elas, destacam-se a utilização de organóides que visam simular órgãos, tais como, o intestino (WALLACH; BAYRER, 2017), estômago (SHIBATA et al., 2017), fígado (GURAL, 2018), pulmões (ZHOU et al., 2018), cérebro (SALICK et al., 2017) e, até mesmo, o coração (NUGRAHA et al., 2019) para o estudo de doenças genéticas e infecciosas.

O presente trabalho tem como objetivo revisar o conhecimento atual de engenharia de tecidos voltado para a pesquisa de modelos de doença, com enfoque em técnicas voltadas para a confecção e uso de organóides para simular infecções.

2. METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado na forma de revisão bibliográfica de literatura do tipo narrativa, na qual há uma apresentação mais abrangente do tema com maior arbitrariedade da seleção de artigos (FALCÃO et al., 2015).

Para o embasamento teórico, foram utilizados livros com enfoque nas características gerais da engenharia de tecidos, artigos científicos e teses acadêmicas que abordassem a engenharia de tecidos aplicada aos estudos e formulação de modelos de doença, assim como, seus atuais mecanismos de produção, desafios e perspectivas para o futuro. Toda a bibliografia foi obtida pela pesquisa em bases de dados nacionais e internacionais: SciELO, PubMed e Google Acadêmico, utilizando as palavras-chave engenharia de tecido; construção de organóides; doenças infecciosas e células-tronco, com foco em artigos escritos em português, inglês ou espanhol, e publicados entre os anos 2014 e 2018.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Princípios de Engenharia de Tecido para Confeção de Organóides

Atualmente, existem três tipos de metodologias utilizadas para a cultura de células em um ambiente tridimensional: o *rotating wall vessel* (RWV) *bioreactor*, matrizes extracelulares com base em colágeno (MEC) e organóides gerados a partir de células-tronco. No biorreator RWV, as células são cultivadas em microesferas e constantemente rotacionadas em um container preenchido com meio de cultura. Este método recapitula mais precisamente a tensão de cisalhamento do fluido, a diferenciação celular e interações patógeno-hospedeiro (BARTFELD; CLEVERS, 2015).

Em matrizes extracelulares 3D, por outro lado, as células são suspensas em géis de colágeno, fibrina, matriz derivada de células composta de proteínas ou extrato de membrana basal (BME ou Matrigel) para reconstituir as propriedades físicas de uma MEC. As matrizes 3D não são capazes de simular movimentos fluidos como o biorreator RWV ou ambientes *in vivo*, mas são usadas para estudar a fixação celular em todos os três eixos e a mobilidade celular através da matriz. Por fim, nos organóides, células-tronco são diferenciadas para recriar aspectos cruciais de arquitetura, composição celular e função dos tecidos *in vivo*, permitindo uma maior variabilidade e adaptabilidade de sua função em pesquisa (DANIELSON, 2018).

3.1.1 Produção celular

Protocolos atuais determinam a necessidade de três pilares estruturais para a criação de um modelo de tecido funcional: (1) uma metodologia para geração da célula/tecido-alvo, (2) a confecção de uma matriz extracelular (MEC) que sirva de suporte estrutural para tais células e, por fim, (3) fatores de crescimento que irão induzir a diferenciação destas células para o tecido específico (AKHTAR, 2017).

O primeiro passo para a produção de um organóide é encontrar uma forma de reproduzir as células-alvo. Este processo atualmente é feito por meio da cultura de células-tronco, sejam elas embrionárias, extraídas de embriões em fase de pré-implantação, células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), derivadas de células maduras reprogramadas para reverterem sua diferenciação celular, ou adultas, encontradas em nichos celulares em vários órgãos do corpo adulto (CHEN; LIU, 2016).

Células-tronco embrionárias (CTEs) são pluripotentes, tendo a capacidade de se desenvolver em qualquer tipo de tecido, dada a combinação certa de substrato e fatores de crescimento. Porém, os organóides resultantes simulam apenas o início do desenvolvimento, produzindo tecidos embrionários ou fetais. Ademais, questionamentos éticos sobre a utilização

de CTEs e a falta de conhecimento preciso sobre material genético das células dificulta, mas não impede, a sua utilização para a confecção de organóides (DIAS; GUILLEMOT, 2017).

Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), por outro lado, também são consideradas pluripotentes. A capacidade de reprogramação de células adultas foi inicialmente descrita em células murinas em 2006 e em células humanas em 2007: as células possuíam todas as características de células-tronco pluripotentes, incluindo a expressão de marcadores de células-tronco e a formação de tumores contendo os três tecidos embrionários (KLIMANSKAYA; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al. 2007; SHEN, 2018).

Por se tratarem de células maduras reprogramadas, obtidas através de células epiteliais de doadores adultos, sua obtenção não requer a destruição ou manipulação de um embrião pré-implantado. De tal forma, as iPSCs não acarretam questionamentos éticos vistos nas CTEs, assim como, permitem aos pesquisadores um conhecimento preciso do material genético das células cultivadas. Por outro lado, tais células necessitam de vetores virais para realizar a inserção dos fatores de transcrição necessários à sua indução, gerando questionamentos quanto à possível tumorigenicidade dos tecidos formados (MCCAULEY; WELLS, 2017; XU et al., 2018).

Células-tronco adultas (CTAs), ou células-tronco somáticas, são consideradas multipotentes, tendo a capacidade de se diferenciarem em uma ou várias linhagens celulares de seu órgão de origem. Esta vantagem permite sua utilização na pesquisa de doenças que afetam tecidos maduros, ao contrário das CTEs e iPSCs, que tendem a formar tecidos embrionários. Por outro lado, o isolamento de tais células em cultura é dificultado pela sua raridade em tecidos desenvolvidos, e metodologias para expandir a quantidade destas em cultura ainda estão sendo desenvolvidos (CHEN; LIU, 2016; SHEN, 2018).

3.1.2 Matriz Extracelular

Independente da metodologia utilizada para a produção celular, o segundo passo para a produção de um organóide é achar um substrato no qual as células-tronco (iPSCs, CTEs ou Adultas) irão se fixar, permitindo sua proliferação e consequente diferenciação (HO et al., 2018).

Atualmente, o substrato mais disseminado entre a comunidade de pesquisa é o Matrigel™, ou Cultrex BME™, uma mistura proteica secretada pelas células Engelbreth-Holm-Swarm de sarcoma murino. O Matrigel se assemelha ao complexo ambiente extracelular

encontrado em vários tecidos, sendo utilizado por pesquisadores como uma matriz de membrana basal para culturas de células (HUGHES, 2010).

A capacidade do Matrigel de estimular comportamentos celulares complexos é uma consequência de sua composição heterogênea. Os componentes-chave do substrato são proteínas estruturais, tais como, laminina, entactina (nidogênio), colágeno e proteoglicanos de sulfato de heparano, que dão às células cultivadas as sequências peptídicas adesivas que elas encontrariam *in vivo*. Em sua forma diluída, utilizada como substrato adesivo na cultura de CTEs, a presença de fatores de crescimento como TGF-beta e EGF impede a diferenciação, promovendo a proliferação de vários tipos celulares. Quando utilizada em sua forma não diluída, o substrato promove o crescimento celular e diferenciação (DIAS; GUILLEMOT, 2017).

Contudo, o Matrigel contém outras proteínas em pequenas quantidades, e sua composição exata pode variar de lote para lote. Por tal motivo, não se recomenda o uso do Matrigel em experimentos que requerem conhecimento preciso de todas as concentrações proteicas do meio (HUGHES, 2010; SIMUNOVIC; BRIVANLOU, 2017).

3.1.3 Fatores de Crescimento

Após escolhidas as células e o substrato para cultivo do organóide, serão necessários fatores de crescimento específicos para se diferenciarem em células maduras dos órgãos-alvos, principalmente membros da família R-spondina (que potenciam a atividade da via de sinalização WNT) e Gremlin 1 e Noggin 1 (que inibem a via BMP). Tais fatores são normalmente produzidos a partir de sistemas eucarióticos de expressão (URBISCHEK, 2019).

Normalmente, em sistemas eucarióticos de expressão, fatores de crescimento são secretados para o interior das células por meio de hospedeiros de expressão, e esse meio condicionado, contendo o fator de crescimento escolhido (e todas as outras proteínas que estas células secretam naturalmente), é então diluído diretamente no meio de cultura de organóides (CHAKRADHAR, 2017; MILES; ESTES, 2016).

Porém, linhagens celulares capazes de expressar R-spondin 1 e Gremlin 1/Noggin 1 não são facilmente acessíveis e o uso de meios condicionados levanta um problema de variância da atividade dos fatores de crescimento de cada lote. Ademais, a presença de proteínas, incluindo fatores de crescimento, presentes no soro de certos meios de cultura, assim como os secretados pelas próprias células cultivadas, podem influenciar o crescimento do organóide (URBISCHEK, 2019).

Protocolos para a geração de organóides intestinais humanos tendem a incluir certos fatores de crescimento que simulem o desenvolvimento intestinal embrionário, tais como a activina-A, a família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e alguns agonistas da via WNT. A activina-A induz a formação definitiva do endoderma, enquanto o FGF/WNT induz a padronização da endoderme, a especificação do intestino posterior e a morfogênese do organóide. O FGF/WNT também promove um sistema de cultura pró-intestinal para estimular o crescimento intestinal, a morfogênese e a citodiferenciação (HO et al., 2018).

Protocolos para a formulação de organóides gástricos tenderam a utilizar fatores similares: fator de crescimento epidermal (EGF), R-spondin, Noggin, WNT, FGF-10, gastrina, e TGF beta-inibidor. Protocolos para organóides hepáticos, por outro lado, utilizavam os fatores BMP4, VEGF, Activina, PDGFBB e FGF2, enquanto organóides pulmonares foram formados com Activina, FGF4, FGF2, Noggin e SHH. Ademais, a confecção de organóides cardíacos provou-se possível através de indução de moléculas pequenas para modular a via WNT, enquanto sua diferenciação através de fatores de crescimento (Activina-A e BMP4) não conseguia gerar micro-câmaras cardíacas consistentes (BARTFELD; CLEVERS, 2015; TAKEBE et al., 2017; DYE et al., 2015; NUGRAHA et al., 2019).

3.2 Modelos do Sistema Gastrointestinal

3.2.1 Intestino

A confecção de modelos intestinais a partir de organóides permite o estudo dos mecanismos de ação de muitos dos mais comuns e problemáticos agentes infecciosos entéricos, como o vírus de RNA dupla-fita, rotavírus, e a bactéria Gram-positiva, *Clostridium difficile* (MILES; ESTES, 2016).

Estima-se que, até os cinco anos de idade, quase todas as crianças do mundo já foram expostas ao rotavírus, afligidas por gastroenterite aguda. A infecção causa cerca de um terço de todas as hospitalizações devido a diarreias agudas nesta faixa de idade e, apesar das significativas taxas de morbidade e mortalidade que esta possui, especialmente em países em desenvolvimento, a relevância do vírus têm sido historicamente negligenciada na comunidade de pesquisa (WHO, 2015).

Estudos feitos por Finkbeiner et al. (2015) demonstraram a capacidade de modelos intestinais humanos feitos através de organóides de agir como hospedeiros para a replicação *in vitro* de rotavírus obtidos por meio de pacientes. Outros, como os de Yin (2015) determinaram que tais organóides conseguiam produzir partículas infectivas do vírus, possibilitando seu uso efetivo como modelos para o estudo de infecções entéricas virais (BARTFELD, 2016).

Nos últimos dez anos, a prevalência de infecção por *C. difficile* tem aumentado em todo o mundo, assim como a morbidade e mortalidade associada à mesma. Por se tratar de uma infecção gastrointestinal, a doença tende a causar sintomas brandos, como dor abdominal, febre, náusea e diarreia, mas suas complicações incluem a evolução da doença para uma colite pseudomembranosa, megacólon ou, até mesmo, a perfuração do cólon, podendo acarretar uma sepse generalizada. Tais complicações remetem a necessidade do estudo continuado da bactéria (BUTLER et al., 2016; KONEMAN et al., 2016).

A patologia do *C. difficile* já havia sido estudada em linhagens de células imortalizadas, mas o desenvolvimento da tecnologia de organóides permitiu tanto a confirmação de descobertas anteriores quanto avanços adicionais no entendimento de mecanismos celulares de citotoxicidade. Além disso, os organóides intestinais demonstraram ser mais permissivos à infecção do que as linhas imortalizadas, modelando mais precisamente o processo infeccioso *in vivo*. Estudos já utilizaram organóides intestinais humanos para examinar o papel patológico das toxinas de *C. difficile* no epitélio intestinal (MILES; ESTES, 2016).

Nos estudos com células imortalizadas, sabia-se que as toxinas A e B de *C. difficile* se ligavam a receptores celulares desconhecidos que ativavam a inibição da família Rho das GTPases, levando a desorganização do citoesqueleto, perda das junções de oclusão, e disrupção tanto da sinalização quanto do ciclo celular. Ademais, entendia-se que a toxina B diminuía a expressão do trocador Na^+/H^+ (NHE3), resultando em um aumento dos sintomas de diarreia (CHAKRADHAR; WALLACH; BAYRER, 2017).

Pesquisadores confirmaram tais achados usando organóides expostos a cepas de *C. difficile* via microinjeção de bactérias cultivadas, materiais fecais de pacientes infectados com a bactéria, ou pelo uso de toxinas purificadas TcdA e TcdB. Tais estudos confirmaram a lesão às junções de oclusão mediadas pelo TcdA e identificaram a regulação positiva do NHE3 como alvo para agentes terapêuticos a fim de interromper o processo pelo qual *C. difficile* cria um ambiente apropriado para seu desenvolvimento. As pesquisas também trouxeram evidências que explicam a melhora gerada pelo uso de lactobacilos, que regulam positivamente a expressão do NHE3. Através de modelos de organóides, é possível que se obtenha maior compreensão da patogênese e dos mecanismos pelos quais *C. difficile* causa sua doença, permitindo o estudo de novos alvos para medicamentos de intervenção terapêutica (WALLACH; BAYRER, 2017; BETANCOURT et al., 2019).

Organóides intestinais também podem modelar outras interações patógeno-hospedeiro, como, por exemplo, as do protozoário apicomplexo *Toxoplasma gondii* e seu espectro de hospedeiros. O *T. gondii* é um parasita obrigatório cujo hospedeiro definitivo é única e

exclusivamente o gato doméstico (*Felis domesticus*). Apesar disto, o *T. gondii* tem a capacidade de infectar virtualmente todos os mamíferos e a utilização de organóides baseados em modelos animais e humanos se mostrou extremamente promissora para o estudo ciclo de vida do parasita (KONEMAN et al., 2016; BETANCOURT et al., 2019).

Os estudos do ciclo intracelular do *T. gondii* em células cultivadas foram inicialmente realizados no Brasil por Moura et al. (2009), caracterizando-se a primeira utilização conhecida de células de tecido epitelial felino, injetadas com bradizoítos de *T. gondii*. Após a invasão de uma célula, a forma proliferativa do parasita (taquizoíto) forma um vacúolo parasitóforo no qual esta se replica até que ocorra a sua saída da célula hospedeira. O estudo demonstrou a dependência do parasita na relação parasita-célula hospedeira para determinar seu destino intracelular (conversão e proliferação de taquizoítos, assim como a manutenção e cultivo dos bradizoítos por meio da formação de cistos).

Visto que a via de infecção mais comum do *T. gondii* ocorre por meio de ingestão dos cistos dos mesmos, o uso de enteróides (organóides derivados de células-tronco intestinais adultas) promove um sistema experimental para simular as interações patógeno-hospedeiro no sítio primário de infecção. Estudos mais recentes, como os de Danielson et al. (2018) e os de Derricott et al. (2018) visaram recapitular a replicação do parasita dentro de seu vacúolo parasitóforo e determinar a viabilidade da confecção de organóides para o estudo do *T. gondii* a partir de tecidos de animais de granja, respectivamente.

No estudo de Danielson et al. (2018), o ambiente de infecção tridimensional natural do *T. gondii* foi reproduzido em um sistema de cultura de células 3D para investigar a replicação do parasita em seu vacúolo parasitóforo e saída do parasita de células hospedeiras. Determinou-se que, enquanto o parasita tendia a escapar perpendicularmente pela superfície plana abaixo das células hospedeiras em culturas bidimensionais, em culturas tridimensionais, os vacúolos parasitóforos possuíam forma globular, e os parasitas saíam de forma radial das células hospedeiras (DANIELSON et al., 2018).

No estudo de Derricott et al. (2018), o jejuno de porcos e bois foi obtido através de um abatedouro e suas criptas intestinais foram isoladas, suspensas em Matrigel, cultivadas, criopreservadas e então reativadas sendo, logo após, infectadas com *T. gondii*. O estudo determinou a viabilidade da produção de organóides através de células de animais de granja, notando como a capacidade de criopreservação e reativação não impede a viabilidade dos mesmos. Por se tratar de uma zoonose relativamente disseminada entre as espécies de mamíferos de granja, espera-se utilizar tal metodologia para aprofundar os estudos da patogênese do *T. gondii* em tais animais (DERRICOTT et al., 2018).

Um maior entendimento do processo do ciclo de vida intracelular do *T. gondii* a partir destes modelos será útil na descoberta e pesquisa de novos tipos de drogas, enquanto a formulação de terapias anti-virais/bacterianas (tanto para o rotavírus, a *C. difficile* e, futuramente, outros patógenos) será facilitada pela pesquisa de tais patógenos em modelos intestinais (BARTFELD, 2016; BETANCOURT et al., 2019).

3.2.2 Estômago

Doenças gastrointestinais tendem a afetar tanto o intestino quanto o estômago, tendendo a se resolver de forma espontânea ou após tratamento. Porém, a ocorrência de certas infecções têm sido associada a progressão de cânceres estomacais e da vesícula biliar, promovendo a necessidade de estudos aprofundados dos mecanismos patogênicos que estariam influenciando estas associações. Presentemente, dois de tais patógenos associados a progressão de cânceres estomacais e da vesícula biliar são as bactérias Gram-negativas *Helicobacter pylori* e *Salmonella enterica*, sorovar Typhi (KONEMAN et al.; MILLS; ESTES; 2016).

H. pylori está presente em mais de 50% da população mundial, e sua infecção é mais comum em países em desenvolvimento. Apesar da bactéria ser altamente associada a gastrite crônica e úlceras gástricas, 80% dos indivíduos infectados são assintomáticos, sugerindo um papel natural da bactéria na microbiota intestinal normal e determinando-se a necessidade de estudos mais aprofundados. O uso de organóides gástricos humanos micro-injetados com cepas da bactéria se tornaram promissores para a confirmação de tais associações (ENGEVIK et al.; HO et al., 2018).

Atualmente, estudos feitos por Amieva e Peek (2016) demonstraram como organóides gástricos tinham a capacidade de modelar a colonização da *H. pylori* no estômago humano, elucidando sua progressão para o câncer estomacal. No ano seguinte, outros modelos se propuseram a recapitular protocolos de organóides gástricos para o estudo da doença, incluindo seus mecanismos de colonização, aderência às células epiteliais, replicação bacteriana, translocação CagA e a indução de respostas dos hospedeiros, tais como apoptose e resposta proliferativa, fatores capazes de explicar a elevada associação da *H. pylori* ao câncer (AMIEVA; PEEK, 2016; POMPAIAH; BARTFELD, 2017).

A infecção por *Salmonella* tende a causar diarreia, febre, dor abdominal e êmese. Mais raramente, a doença pode evoluir para febre tifóide. Ambas as suas formas de apresentação geram um fardo pesado para a saúde pública em nível mundial, sendo uma das causas mais comuns de diarreia. Em 2015, mais de 90000 mortes ocorreram por salmonelose não-tifóide e mais de 170000 por salmonelose tifóide (GBD 2015, 2015).

Estudos da virulência da bactéria a partir de organóides gástricos geraram as primeiras evidências que a infecção por *S. enterica* é um fator causativo de carcinoma biliar. Confirmou-se que a bactéria alterava o transcriptoma dos organóides para ativar as vias cinase Akt e MapK, que são comumente elevadas em cânceres humanos, demonstrando a capacidade de organóides gástricos de simularem a interação patógeno-hospedeiro a níveis moleculares (YIN; ZHOU, 2018).

3.2.3 Fígado

A criação de modelos hepáticos para estudo de infecção têm sido um processo complexo. Grande parte dos patógenos que atacam o fígado possuem tropismo por sua célula mais abundante, o hepatócito, a qual necessitam para completar seu ciclo de vida. Porém, apesar de seu grande potencial regenerativo *in vivo*, hepatócitos primários são difíceis de serem mantidos *in vitro*, necessitando aderência a uma matriz extracelular apenas para sobreviverem por algumas horas (PROTZER et al., 2012).

Os mecanismos de interação patógeno-hospedeiro de espécies do vírus de RNA fita simples HCV e o vírus de DNA dupla fita parcial HBV, causadores de hepatite C e B, respectivamente, assim como espécies do protozoário causador da malária, *Plasmodium spp.*, já haviam sido estudados em tais culturas, porém, o curto tempo de vida das células utilizadas dificultava qualquer tentativa de análise a longo prazo (GURAL, 2018).

O HVB e o HVC infectam mais de 350 milhões de pessoas mundialmente, sendo as principais causas de doenças hepáticas crônicas, como cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. As espécies de *Plasmodium*, por outro lado, causam aproximadamente 200 milhões de casos de malária por ano. Juntos, estes três patógenos possuem altas taxas de morbidade e mortalidade a nível mundial, justificando a relevância de pesquisa de seus mecanismos de ação no ser humano (WHO, 2017; GURAL, 2018)

O uso de monoculturas bidimensionais derivadas de hepatomas (células cancerígenas imortalizadas) se mostrou uma forma prática e renovável de se obter hepatócitos para pesquisa, mesmo que por períodos clínicos relativamente curtos (horas ou apenas alguns dias). Porém, certos isolados, como algumas cepas de HCV, não tinham capacidade de infectar linhagens imortalizadas e requeriam hepatócitos humanos primários para sua propagação, retomando-se o obstáculo principal: a obtenção e manutenção a longo prazo de hepatócitos adultos (GOTTWEIN; BUKH, 2008).

A inclusão de células-troncos pluripotentes (tanto embrionárias quanto induzidas) ao arsenal do laboratório de pesquisa veio como uma forma alternativa de obtenção células

hepáticas viáveis para pesquisas deste âmbito. Sua utilização inicialmente trouxe várias vantagens ao estudo das interações patógeno-hospedeiro, por utilizar genomas celulares facilmente mapeados e rastreáveis, mas também teve sua aplicabilidade limitada enquanto o uso de monoculturas bidimensionais impossibilitasse uma replicação complexa do microambiente hepático, impedindo a observação de influências externas, como o impacto de diferentes tipos celulares no processo infeccioso (PETERSON; LORING, 2014).

A despeito de tais limitações, o avanço de pesquisa na área não foi impedido. Por exemplo, a infecção *in vitro* de hepatócitos deficientes em CD81 com diferentes espécies de *Plasmodium* (*P. vivax* e *P. falciparum*) forneceu informações sobre os fatores específicos necessários para sua entrada em hospedeiros e o estabelecimento da infecção por malária em hospedeiros suscetíveis. A comparação entre diferentes tipos de células HepaRG, por outro lado, conseguiu confirmar o transportador hepato-ácido biliar (NTCP) como o receptor de entrada usado tanto pelo HBV quanto pelo vírus da hepatite D para infectar hepatócitos humanos (NI et al., 2014).

Além disso, o uso de modelos tridimensionais do fígado têm sido bastante utilizado para complementar as pesquisas feitas em culturas bidimensionais. Uma das primeiras tentativas para modelar a infecção por HCV em ambiente tridimensional se utilizou de um biorreator RWV para cultivar uma linhagem celular derivada de hepatoma humano. As células cultivadas mantiveram-se em um estado polarizado, capaz de suportar infecção produtiva pelo vírus por meses, tendo suas condições de cultura exponencialmente aprimoradas quando comparadas aos seus homólogos de culturas bidimensionais, cujo maior tempo de vida chegava a apenas 72 dias (ZHOU et al., 2014).

Ademais, a formulação de modelos hepáticos para estudo de infecção não tem beneficiado apenas pesquisas com os vírus da hepatite e o *Plasmodium*. O uso de culturas de células imortalizadas têm sido útil no estudo de vários outros patógenos hepatotrópicos, como o citomegalovírus, o vírus causador da dengue e o protozoário *Entamoeba histolytica*. (GURAL, 2018).

Notavelmente, o uso de microambientes tridimensionais para replicar a estrutura hepática têm sido utilizado para observar a mecânica por trás da migração do *E. histolytica* pelas células endoteliais hepáticas. As camadas de células humanas são separadas por uma matriz de colágeno, permitindo a visualização da penetração na barreira celular e a migração dos parasitas em direção aos hepatócitos, remontando à invasão inicial do fígado e levando à destruição do parênquima e à formação de abscessos (PETROPOLIS et al., 2016).

3.3 Modelos do Sistema Respiratório

3.3.1 Pulmões e trato respiratório

Modelos organóides das vias respiratórias e pulmões têm sido utilizados para estudar mecanismos de patologia de várias doenças virais, bacterianas e parasitárias, como a influenza, tuberculose e criptosporidiose, respectivamente. Espera-se que tais modelos sejam utilizados para facilitar o estudo epidemiológico e a prevenção da ocorrência de tais doenças por meio da pesquisa de novas metodologias preventivas (NAWY, 2018).

Apesar de mais comumente infectar aves silvestres, as diversas cepas do vírus da Influenza A podem causar doença severa tanto em aves domésticas e certos mamíferos, incluindo seres humanos. O vírus de RNA fita simples tem alta capacidade de evoluir e se adaptar a novos hospedeiros, devido principalmente a seu genoma segmentado e a baixa fidelidade da RNA polimerase, que permitem a mudança e deriva antigênica. Assim, por muitas vezes, cepas do vírus atravessam a barreira entre espécies e infectam seres humanos, levando a infecções esporádicas, epidemias e, até mesmo, pandemias (WHO, 2019).

Em 2009, a primeira pandemia de influenza do século foi causada por uma cepa nova do vírus, H1N1, que se originou de múltiplos rearranjos de cepas clássicas de influenza aviária e suína. O evento estabeleceu a primeira caracterização de transmissão contínua de humano para humano e o vírus se mantém circulante como um vírus sazonal desde então (BRASIL, 2019).

A despeito do tremendo progresso feito nas áreas de virologia e epidemiologia, uma das questões mais importantes e desafiadoras para a pesquisa de influenza é prever qual cepa viral emergente ou de animais pode infectar seres humanos. Tais estudos têm sido facilitados pela criação de organóides das vias aéreas, permitindo uma rápida avaliação da infectividade de vírus emergentes (ZHOU et al., 2018).

Modelos *in vitro* atuais para o estudo da infecção no trato respiratório (TR) envolvem culturas de curto prazo de células epiteliais do TR e explantes pulmonares, que não são facilmente obtidos. Ademais, a rápida deterioração do tecido primário é um grande problema em estudos de infecção, visto que não existem protocolos para manutenção da viabilidade do tecido. De tal forma, tais tecidos e células dificilmente constituem um modelo conveniente e reprodutível para o estudo de patógenos respiratórios humanos, demonstrando-se a necessidade de modelos *in vitro* biologicamente relevantes, reprodutíveis e acessíveis para o estudo de patologias do trato respiratório humano (BUTLER et al. 2016).

O estudo de Zhou et al. (2018), por exemplo, estabeleceu várias linhagens de organóides derivados de TR humano a partir de tecidos doados por pacientes submetidos a ressecções

cirúrgicas. Os organóides, diferenciados em meio PneumaCult-ALI, apresentaram quatro tipos principais de células epiteliais do TR: células ciliadas, células caliciformes, células basais e células em escova. O meio de cultura utilizado aumentou significativamente a diferenciação de células ciliadas, reproduzindo tanto seus níveis fisiológicos no corpo quanto sua morfologia funcional.

Cepas virais com poder de infecção conhecido foram utilizadas para demonstrar a capacidade de tais organóides de reproduzir uma maior suscetibilidade de infecção a vírus com alto poder de infecção, concomitantemente, uma baixa suscetibilidade de infecção a vírus com baixo poder de infecção em humanos. Os modelos suportaram a replicação ativa das cepas H7N9 e H1N1, infectivas em humanos. A cepa H7N2, por outro lado, conhecida por co-circular com a H7N9 em aves domésticas, mas não por infectar humanos, replicou-se de forma pouco eficiente nos modelos. Similarmente, a cepa suína do H1N1 demonstrou uma capacidade de crescimento muito reduzida quando comparada a sua variante humana, H1N1pdm (ZHOU et al., 2018).

Apesar da existência de métodos preventivos efetivos, a tuberculose permaneceu a maior causa de óbitos por doença infecciosa em 2017. Seu agente etiológico, a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, não se cora pela coloração de Gram devido à seu revestimento de ácido micólico, fato que pode estender o tempo de diagnóstico de uma doença que se mantém altamente infecciosa (WHO, 2018; KONEMAN et al., 2016).

Por necessitar de níveis elevados de oxigênio para sobreviver, *M. tuberculosis* infecta primariamente o trato respiratório de mamíferos, com tropismo acentuado para o tecido pulmonar. Estudos com organóides pulmonares derivados de CTAs com enfoque na bactéria têm sido realizados principalmente para reproduzir mais precisamente os mecanismos de atuação de fatores de virulência previamente descobertos a partir de pesquisas prévias, como o sistema ESX-1 (WONG, 2017).

O ESX-1 é codificado pelo *locus* genético RD1, que é deletado nas cepas utilizadas na vacina contra a doença. Estudos prévios determinaram que a introdução de tal gene em cepas da bactéria é suficiente para induzir o crescimento bacteriano no pulmão e baço, levando a esplenomegalia, inflamação e formação de abscessos no fígado e rins de murinos. O processo de lise de macrófagos característico da doença também foi associado à existência do *locus* RD1. Tais achados foram replicados e confirmados em organóides pulmonares derivados de células-tronco adultas humanas (IAKOBACHVILI; PETERS, 2017).

O estudo do parasita apicomplexo *Cryptosporidium parvum* é dificultado pelos requerimentos complexos de seu ciclo de vida. A doença causada pelo parasita tende a se dar

de duas formas, a criptosporidiose intestinal, que atinge principalmente crianças em países em desenvolvimento, e a criptosporidiose pulmonar, uma versão menos comum da doença que tende a afetar pacientes imunocomprometidos. Por se tratar de uma aflição cujas consequências maiores atingem principalmente grupos ainda negligenciados na área clínica, como portadores de doenças auto-imunes, o estudo contínuo da doença se torna necessário (KUMAR et al., 2016).

As metodologias de cultura *in vitro* do parasita têm encontrado vários obstáculos: monocamadas de células epiteliais primárias, comumente utilizadas, suportam apenas a infecção a curto prazo do *C. parvum*, com propagação celular e progressão do ciclo celular incompletas. Heo et al. (2018) demonstraram como organóides pulmonares derivados de doadores humanos podem ser utilizados como modelos para infecção por *Cryptosporidium*.

Seu modelo, que utilizou tanto organóides intestinais quanto das vias aéreas brônquicas, suportaram todo o ciclo de vida do parasita a longo prazo, permitindo futuros estudos a respeito da rota de infecção do epitélio pulmonar, ainda pouco estudada. Tais novos modelos ajudarão a desvendar a fisiopatologia do *Cryptosporidium* e suas interações com as células humanas (HEO et al. 2018).

3.4 Modelos do Sistema Reprodutivo

3.4.1 Tubas uterinas

Atualmente, clamídia é uma das doenças sexualmente transmissíveis com maior prevalência em âmbito mundial, causada pela infecção pela bactéria Gram-negativa *Chlamydia trachomatis*. Normalmente, a infecção pela *C. trachomatis* se dá de forma assintomática, favorecendo o desenvolvimento de infecções crônicas que, em mulheres, podem ascender às tubas uterinas. Este acontecimento está associado com infertilidade, gravidez ectópica e, até mesmo, câncer ovariano. Visto que as infecções pela *C. trachomatis* são tão comuns, tais consequências são causa de preocupação e estudos utilizando-se organóides tentaram elucidar as causas de tal associação (KONEMAN et. al, 2016).

No estudo de KESSLER et al. (2019), por exemplo, culturas cultivadas a partir de tubas uterinas humanas foram infectadas com a *C. trachomatis*. Contrastantemente aos modelos convencionais de infecção, que permitem a propagação da bactéria por apenas um ciclo de vida, devido à lise de células infectadas, os organóides não apenas acomodaram as colônias bacterianas por longos períodos de tempo, como também, continuaram a se expandir numa velocidade normal, a despeito da infecção ativa.

O estudo descreveu que os organóides reagiram à bactéria de forma a produzir um mensageiro inflamatório (LIF) associado à gravidez ectópicas, sendo a primeira evidência concreta do possível mecanismo por trás desta complicação. Ademais, observou-se mudanças permanentes no DNA das células infectadas persistindo, até mesmo, após as bactérias serem eliminadas. Tais mudanças epigenéticas poderiam explicar como a infecção por *Chlamydia* é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer ovariano (KESSLER et al., 2019).

3.5 Modelos do Sistema Nervoso

3.5.1 Cérebro

O agente etiológico da Zika (ZIKV) causou uma epidemia generalizada no território brasileiro entre os anos de 2015 e 2016. A infecção raramente se apresentava sintomática, imitando uma forma mais branda de dengue, uma coincidência que dificultava o diagnóstico, visto que ambas as patologias possuem o mesmo vetor. A transmissão do vírus também ocorria de forma sexual e vertical, levando a uma séria complicação: a transmissão do vírus de mães grávidas para seus filhos no útero, resultando em microcefalia fetal, malformações cerebrais severas e outros defeitos de nascença, além de, raramente, levar a síndrome de Guillain-Barré em adultos infectados. Como a Zika não podia ser prevenida por medicamentos ou vacinas, estudos sobre os mecanismos de como o vírus atuava na geração de tais complicações se tornaram de extrema importância para a formulação de metodologias preventivas e terapêuticas (SHEN, 2018).

A utilização de organóides cerebrais a partir iPSCs têm trazido evidências a favor da relação entre o ZIKV e a incidência de microcefalia em neonatos. Em 2013, pesquisadores desenvolveram organóides cerebrais a partir de células pluripotentes derivadas de fibroblastos a fim de estudar a fisiopatologia do vírus. Tais organóides apresentavam padrões moleculares de múltiplas regiões cerebrais, incluindo o hipocampo e córtex pré-frontal, permitindo que os pesquisadores simulassem uma versão de microcefalia (LANCASTER et al., 2013).

Nos próximos anos, vários experimentos utilizando-se modelos cerebrais criados em organóides iriam elucidar como o ZIKV infiltra o cérebro em desenvolvimento e como este impedia o desenvolvimento neural: acreditava-se que o ZIKV apresentava tropismo viral por células progenitoras neurais. Um modelo proposto por Salick et al. (2017), confirmou tal afirmação, gerando organóides com alta carga viral dentro de células progenitoras que, eventualmente, sofreram morte celular severa e levaram a microcefalia do organóide. Por ser uma melhoria de modelos bidimensionais e possuir arquitetura celular e expressão proteica específica de células humanas, tais modelos permitem que pesquisadores conduzam

experimentos para observar e potencialmente intervir na infecção por ZIKV no cérebro humano (SALICK et al., 2017; QIAN et al., 2017).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia de organóides possui um grande potencial para a pesquisa de modelos de doença. A tecnologia tem providenciado à pesquisadores a possibilidade de gerar modelos de doenças humanas complexos, escaláveis e sem a utilização de animais, permitindo uma maior acurácia na simulação de patologias. A exploração da cultura de organóides intestinais como modelos de patologias infecciosas, por exemplo, se mostra uma grande oportunidade para a contínua descoberta e intervenção em doenças infecciosas entéricas.

Apesar do tremendo progresso na última década quanto ao estudo e aplicação da tecnologia de organóides, com vários estudos fornecendo evidências positivas para a utilização de tal tecnologia para a formulação de modelos de doença humana, ainda existem várias limitações no seu uso. De tal forma, é necessário que pesquisadores considerem as vantagens e desvantagens da utilização de modelos bi- ou tridimensionais para determinar a melhor estratégia de pesquisa para seus estudos, enquanto mais tempo é dado para permitir o desenvolvimento da tecnologia de organóides para modelar doenças.

Talvez a abordagem de pesquisa mais abrangente no momento seja a utilização de uma combinação de modelos bi- e tridimensionais, juntamente com modelos animais, de modo a fornecer uma compreensão extensiva e confiável dos mecanismos moleculares envolvidos em patologias humanas. Futuramente, porém, pode-se esperar que organóides humanos complexos continuem a ser utilizados para otimizar a pesquisa de drogas para fins terapêuticos, assim como para fornecer um maior entendimento da fisiologia dos órgãos humanos e suas interações com uma multiplicidade de patógenos.

6. REFERÊNCIAS

- AKHTAR, A. et al. Organoid and Organ-on-a-Chip Systems: New Paradigms for Modeling Neurological and Gastrointestinal Disease. **Current Stem Cell Reports**, Amsterdã, v. 3, n. 2, p. 98-111, jun. 2017.
- AMIEVA, M.; PEEK, R. M. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. **Gastroenterology**, Filadélfia, v. 150, n. 1, p. 64-78, jan. 2016.
- BARTFELD, S. Modeling infectious diseases and host-microbe interactions in gastrointestinal organoids. **Developmental Biology**, San Diego, v. 420, n. 2, p. 262-270, set. 2016.

BARTFELD, S.; CLEVERS, H. Organoids as Model for Infectious Diseases: Culture of Human and Murine Stomach Organoids and Microinjection of *Helicobacter Pylori*. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, n. 105, nov. 2015.

BETANCOURT, E. et al. From Entry to Early Dissemination—*Toxoplasma gondii*'s Initial Encounter With Its Host. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 9, mar. 2019.

BRASIL. **Informações técnicas e recomendações sobre a sazonalidade de influenza 2019**. Brasília: Ministério da Saúde, mar. 2019.

BUTLER, M. et al. Early Diagnosis, Prevention, and Treatment of *Clostridium difficile*: Update. **Comparative Effectiveness Reviews**, Rockville, n. 172, mar. 2016.

BUTLER, C. R. et al. Rapid expansion of human epithelial stem cells suitable for airway tissue engineering. **American journal of respiratory and critical care medicine**, Nova Iorque, v. 194, n. 2, p. 156-68, jul. 2016.

CHAKRADHAR, S. Disease in three dimensions: Tissue engineering takes on infectious disease. **Nature Medicine**, Londres, v. 23, n. 1, p. 2-4, 2017.

CHEN, F. M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, Amsterdã, v. 53, p. 86-168, fev. 2016.

DANIELSON, J. J. et al. Modelling *Toxoplasma gondii* infection in a 3D cell culture system In Vitro: Comparison with infection in 2D cell monolayers. **PLOS ONE**, São Francisco, v. 13, n. 12, e0208558, dec. 2018.

DERRICOTT, H. et al. Developing a 3D intestinal epithelium model for livestock species. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 375, n. 2, p. 409-424, fev. 2018.

DIAS, C.; GUILLEMOT, F. Revealing the inner workings of organoids. **The EMBO Journal**, Londres, v. 36, n. 10, p. 1299-1301, mai. 2017.

DYE, B. R., et al. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. **eLife**, Cambridge, v. 4, p. E05098, mar. 2015.

ENGEVIK, K. A. et al. Organoids as a Model to Study Infectious Disease. **Methods in Molecular Biology**, Nova Iorque, v. 1734, p. 71-81, 2017.

FALCÃO, D. P. et al. Initial steps in writing an submitting a research paper. **Geriatrics, Gerontology and Aging**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 3-9, dec. 2015.

FINKBEINER, S. R. et al. Stem Cell-Derived Human Intestinal Organoids as an Infection Model for Rotaviruses. **mBio**, Washington, v. 3, n. 4, p. e00159-12, jul.-ago. 2012.

GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators (GBD 2015). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, Londres, v. 388, n. 10053, p. 1459-1544, out. 2016.

GOTTWEIN, J. M.; BUKH, J. Cutting the gordian knot-development and biological relevance of hepatitis C virus cell culture systems. **Advances in virus research**, Nova Iorque, v. 71, p. 51-133, 2008.

GURAL, N. et al. Engineered Livers for Infectious Diseases. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, Filadélfia, v. 5, n. 2, p. 131-144, fev. 2018.

HEO, I. et al. Modelling Cryptosporidium infection in human small intestinal and lung organoids. **Nature Microbiology**, Londres, v. 3, n. 7, p. 814-823, jul. 2018.

HO, B. X. et al. Disease Modeling Using 3D Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 4, p. E936, abr. 2018.

HUGHES, C. S. et al. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. **Proteomics**, Hoboken, v. 10 n. 9, p. 1886-1890. jan. 2010.

IAKOBACHVILI, N.; PETERS, P. J. Humans in a Dish: The Potential of Organoids in Modeling Immunity and Infectious Diseases. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 2402, dez. 2017.

KESSLER, M. et al. Chronic Chlamydia infection in human organoids increases stemness and promotes age-dependent CpG methylation. **Nature Communications**, Londres, v. 10, n. 1, p. 1194, mar. 2019.

KLIMANSKAYA, I. et al. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. **Nature**, Londres, v. 444 n. 7118, p. 481-485, nov. 2006.

KONEMAN, E. W. et al. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology)**, 7. Ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2016.

KUMAR, H. et al. Pulmonary cryptosporidiosis in an immunocompetent host treated successfully with nitazoxanide. **Lung India: official organ of Indian Chest Society**, Bombay, v. 33, n. 1, p. 69-71, jan.-fev. 2016.

LANCASTER, M. A. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. **Nature**, Londres, v. 501, n. 7467, p. 373-379, set. 2013.

LANCASTER, M. A.; KNOBLICH, J. A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. **Science**, Nova Iorque, n. 6194, v. 345, p. 283-92, jul. 2014.

MCCAULEY, H. A.; WELLS, J. M. Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. **Development**, Cambridge, v. 144, n. 6, p. 958-962, mar. 2017.

MILLS, M.; ESTES, M. K. Physiologically relevant human tissue models for infectious diseases. **Drug discovery today**, Londres, v. 21, n. 9, p. 1540-1552, set. 2016.

MOURA, M. A. et al. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for Toxoplasma gondii enteric cycle studies. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 6, p. 862-864, set. 2009.

NAWY, T. Organoid hosts for parasitic infection. **Nature Methods**, Londres, v. 15, n. 9, p. 652-652, set. 2018.

NI, Y. et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. **Gastroenterology**, Filadélfia, v. 146, n. 4, p. 1070-83, abr. 2014.

NUGRAHA, B. et al. Human Cardiac Organoids for Disease Modeling. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, Hoboken, v. 105, n. 1, p. 79-85, jan. 2019.

PETERSON, S. E.; LORING, J. F. Genomic Instability in Pluripotent Stem Cells: Implications for Clinical Applications. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 289, n. 8, p. 4578-4584, fev. 2014.

PETROPOLIS, D. B. et al. Human Liver Infection in a Dish: Easy-To-Build 3D Liver Models for Studying Microbial Infection. **PLOS ONE**, São Francisco, v. 11, n. 2, p. e0148667, fev. 2016.

POMPAIAH, M.; BARTFELD, S. Gastric Organoids: An Emerging Model System to Study *Helicobacter pylori* Pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Nova Iorque, v. 400, p. 149-168, jan. 2017.

PROTZER, U. et al. Living in the liver: hepatic infections. **Nature Reviews. Immunology**, Londres, v. 12, n. 3, p. 201-13, fev. 2012.

QIAN, X. et al. Using brain organoids to understand Zika virus-induced microcephaly. **Development**, Cambridge, v. 144, n. 6, p. 952-957, mar. 2017.

SALICK, M. R. et al. Modelling Zika Virus Infection of the Developing Human Brain In Vitro Using Stem Cell Derived Cerebral Organoids. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, v. 127, n. 56404, 10 p., set. 2017.

SIMIAN, M.; BISSELL, M. J. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. **The Journal of Cell Biology**, Nova Iorque, v. 216, n. 1, p. 31-40, jan. 2017.

SIMUNOVIC, M.; BRIVANLOU, A. H. Embryoids, organoids and gastruloids: new approaches to understanding embryogenesis. **Development**, Cambridge, v. 144, n. 6, p. 976-985, mar. 2017.

SHEN, H. Core Concept: Organoids have opened avenues into investigating numerous diseases. But how well do they mimic the real thing?. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 115, n. 14, p. 3507-3509, abr. 2018.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, Cambridge, v. 131 n. 5, p. 861-872, nov. 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, Cambridge, v. 126, n. 4, p. 663-676, ago. 2006.

TAKEBE, T. et al. Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells. **Cell Reports**, Amsterdã, v. 21, n. 10, p. 2661-2670, dec. 2017.

URBISCHEK, M. et al. Organoid culture media formulated with growth factors of defined cellular activity. **Scientific Reports**, Londres, v. 9, n. 1, p. 6193, abr. 2019.

WALLACH, T. E.; BAYRER, J. R. Intestinal Organoids: New frontiers in the study of intestinal disease and physiology. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Filadélfia, v. 64 n. 2, p. 180-185, fev. 2017.

WONG K. The Role of ESX-1 in Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis. In: JACOBS, W. et al., **Tuberculosis and the Tubercle Bacillus**, 2. Ed. Washington: ASM Press, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Rotavirus Surveillance and Information Bulletin. **Vaccine Preventable Diseases Surveillance**, Geneva, v. 10, 4 p., jan. 2015.

_____. **Influenza Update N° 340**. Geneva: World Health Organization, 2019.

_____. **Global Tuberculosis Report 2018**. Geneva: World Health Organization, 2018.

_____. **World malaria report 2017**. Geneva: World Health Organization, 2017.

XU, H. et al. Organoid technology in disease modelling, drug development, personalized treatment and regeneration medicine. **Experimental Hematology & Oncology**, Nova Iorque, v. 7, n. 30, dez. 2018.

YIN, Y. et al. Modeling rotavirus infection and antiviral therapy using primary intestinal organoids. **Antiviral Research**, Amsterdã, v. 123, p. 120-131, set. 2015.

YIN, Y.; ZHOU, D. Organoid and Enteroid Modeling of Salmonella Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 102, abr. 2018.

ZHOU, J. et al. Differentiated human airway organoids to assess infectivity of emerging influenza virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 115, n. 26, p. 6822-6827, jun. 2018.

ZHOU, M. et al. Long-term maintenance of human fetal hepatocytes and prolonged susceptibility to HBV infection by co-culture with non-parenchymal cells. **Journal of virological methods**, Amsterdã, v. 195, p. 185-93, jan. 2014.